

# 全反式维甲酸与 PD98059 联合应用抑制结肠癌细胞的增殖

陈艳<sup>1</sup>, 殷平<sup>1△</sup>, 金光辉<sup>2</sup>, 朱留伟<sup>2</sup>, 田瑞华<sup>3</sup>

(<sup>1</sup> 福建医科大学教学医院-厦门大学附属中山医院 病理科, 福建 厦门 361004;

<sup>2</sup> 厦门大学医学院 基础医学部实验室, 福建 厦门 361006;

<sup>3</sup> 厦门市妇幼保健院 病理科, 福建 厦门 361003)

**【摘要】** 目的 本实验拟通过阐明全反式维甲酸 (ATRA) 与 MEK1/2 的特异性抑制剂 PD98059 联合作用对结肠癌细胞增殖的影响。方法 实验分组: 未加药对照组, ATRA 加药组, ATRA 与 PD98059 联合加药组。MTT 法检测 PD98059 联合 ATRA 对结肠癌细胞株 LS174T 的增殖抑制作用。流式细胞仪检测结肠癌细胞凋亡情况。结果 MTT 法显示 PD98059 联合 ATRA 应用引起细胞抑制效果明显优于单个药物作用的效果。流式细胞仪检测也表明两种药物联合应用引起结肠癌细胞凋亡效果明显优于任一单个药物。结论 ATRA 与 PD98059 联合应用可通过引起结肠癌细胞凋亡, 从而抑制癌细胞增殖。

**【关键词】** 全反式维甲酸; PD98059; 结肠肿瘤; 凋亡

中图分类号: R735.3+5

文献标识码: A

doi:10.3936/j.issn.1674-4659.2011.03.0323

## The Prolition of Colonal Cancer Was Inhibited by Combination of All-trans Retinal Acid (ATRA) and PD98059

CHEN Yan<sup>1</sup>, YIN Ping<sup>1</sup>, JIN Guanghui<sup>2</sup>, ZHU Liuwei<sup>2</sup>, TIAN Ruihua<sup>3</sup>

(<sup>1</sup>Department of Pathology, Zhongshan Hospital, Fujian Medical University, Xiamen 361004, China;

<sup>2</sup>Department of Basic Medical Sciences, Medical College, Xiamen University, Xiamen 361006, China;

<sup>3</sup>Department of Pathology, Xiamen Maternity and Child Care Hospital, Xiamen 361003, China)

**【Abstract】** **Objective** To illustrate the effect on the growth of colonal cancer by all-trans retinal acid (ATRA) and MEK1/2 inhibitor PD98059. **Methods** The cells were divided into different groups: control group, the group treated with ATRA (AT), the group preincubated with MEK inhibitor PD98059 30 minutes prior to ATRA treatment (PD+AT). The proliferation and apoptosis of the LS174T colonal cancer cells were observed by MTT assay and flow cytometric analysis. **Results** By analysis of MTT and flow cytometric, the proliferation of the colonal cancer cells was obviously inhibited by PD+AT group superior to ATRA group. The apoptotic rate of PD+AT group was much higher than the control. **Conclusion** The growth of the LS174T colonal cancer cell was significantly suppressed by ATRA and PD98059.

**【Key words】** All-trans retinal acid (ATRA); PD98059; Colonal tumor; Apoptosis

结肠癌是消化道常见的恶性肿瘤, 其发病率在我国仅次于胃癌和食道癌, 居消化道恶性肿瘤的第 3 位。全反式维甲酸 (ATRA) 属于维生素 A 类化合物家族, 能够诱导多种肿瘤细胞分化或抑制肿瘤细胞的增殖。PD98059 是 ERK1/2 信号通路中的一种细胞渗透性和选择性的特异性阻断剂。本实验旨在阐明两种药物对结肠癌增生的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 主要试剂

RPMI1640 培养液、胎牛血清、胰酶、青链霉素均购于 Hyclone 公司。ATRA、PD98059 (MEK 抑制剂)、MTT、DMSO 购于 Sigma 公司; Annexin-V 凋亡试剂盒购于 Biomiga 公司。

收稿日期: 2010-12-19 修回日期: 2011-01-25

基金项目: 厦门市科技局基金资助项目 (No.3502Z20074019)

作者简介: 陈艳 (1977-) 女, 福建福清人, 住院医师, 硕士研究生在读, 研究方向: 肿瘤分子病理学。

### 1.1.2 细胞培养

结肠癌细胞株 LS174T 购于中科院上海细胞生物研究所, 用含 10% 胎牛血清、1% 青链霉素的 RPMI1640 培养液, 在 37℃, 5%CO<sub>2</sub> 温箱中培养。待细胞长至铺满瓶底传代。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 实验分组 MTT 法测细胞增殖水平

ATRA 溶于无水酒精, PD98059 溶于 DMSO。取处于增殖期的 LS174T 细胞以  $5 \times 10^4$  个/孔密度接种于 96 孔板。实验分 5 组: ①  $10^{-5}$  mol/L PD98059 预处理 30 min 后 +  $10^{-5}$  mol/L ATRA; ②  $10^{-6}$  mol/L PD98059 预处理 30 min 后 +  $10^{-5}$  mol/L ATRA; ③  $10^{-7}$  mol/L PD98059 预处理 30 min 后 +  $10^{-5}$  mol/L ATRA; ④ 单纯  $10^{-5}$  mol/L ATRA; ⑤ 单纯培养液+细胞。每组均设 6 复孔。实验组分别在加药 2 d 后终止培养, 每孔加入 MTT (5mg/ml) 20  $\mu$ L, 37℃ 孵育 4 h 后弃上清, 每孔加入 DMSO 150  $\mu$ L, 摇动混匀, 室温暗处放置 10 min, 酶标仪 570 nm 波长测定各孔吸光度 (A)。结果用  $\bar{x} \pm s$  表示。

#### 1.2.2 流式细胞仪检测凋亡

以  $5 \times 10^5$ /mL 密度接种 LS174T 细胞接种于培养瓶中, 贴壁

后换以无血清饥饿培养 24 h, 按分组加药, 2 d 后收集细胞, 使重悬于 200  $\mu$ L Binding Buffer, 分别加入 5  $\mu$ L Annexin V 和 5  $\mu$ L PI, 轻轻混匀, 避光室温反应 15 min, 加入 300  $\mu$ L Binding Buffer, 1 h 内上流式细胞仪检测。实验重复 3 次。

### 1.3 统计学分析

采用 SPSS 13.0 统计软件包统计分析, 以 one-way ANOVA 进行方差分析, 配对 *t* 检验。数据以均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 以  $P < 0.05$  作为有统计学意义的检验标准。

## 2 结果

### 2.1 PD98059 与 ATRA 联合应用明显抑制 LS174T 细胞增生

结肠癌 LS174T 细胞在不同条件下培养 48 h 后, MTT 法检测其生长状况: LS174T 细胞株经单纯  $10^{-5}$  mol/L ATRA 作用后, 细胞吸光度明显低于正常不加药对照组。差异有高度显著性意义 ( $P < 0.01$ )。而用不同浓度  $10^{-5}$ 、 $10^{-6}$ 、 $10^{-7}$  mol/L PD98059 预处理 LS174T 细胞半小时后加入  $10^{-5}$  mol/L ATRA, 发现结肠癌细胞抑制率随药物作用浓度的上升而升高。提示 PD98059 浓度越高, 细胞抑制程度越大。且比单用 ATRA, PD98059 与 ATRA 联用明显抑制了细胞增生 ( $F=4.2606$ ,  $P < 0.05$ , 见图 1)。

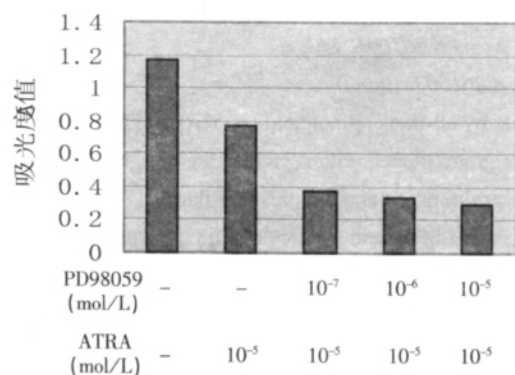


图 1 柱形图示 PD98059、ATRA 作用 2 天后结肠癌 LS174T 细胞的 A570 nm 值

Figure 1 MTT assay for LS174T cell growth after PD98059 and ATRA treatment. The cell proliferation was significantly inhibited by PD98059 and ATRA than by ATRA after 2 days.

配对 *t* 检验: 单纯 ATRA 实验组 *vs* 正常对照组,  $t=35.01$ ,  $P < 0.01$ 。

*F* 检验: 正常对照组 *vs* 不同浓度 PD98059+ATRA 组,  $F=4.2606$ ,  $P < 0.05$ 。

### 2.2 PD98059 与 ATRA 联合应用引起结肠癌 LS174T 细胞凋亡效果更显著

我们运用 Annexin V 和 PI 双重标记激发 LS174T 细胞株, 用流式细胞仪分析 LS174T 细胞的凋亡情况。结果如表 1 图 2 所示: 应用 ATRA ( $10^{-5}$  mol/L) 处理细胞 48 h 后, 细胞凋亡率 (UR+LR) 为 25.17%, 与对照组结肠癌细胞 (18.1%) 相比, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), ATRA 与 PD98059 共同作用后诱导效果明显, 凋亡率上升至 26.53%, 30.33%, 32.47% ( $P < 0.01$ ), 可见应用 PD98059 抑制 ERK 信号通路后可部分增强结肠癌细胞对 ATRA 的敏感性。

表 1 ATRA、PD98059 作用于 LS174T 细胞 2 天后细胞凋亡率

组别	凋亡率 (%)
对照组	18.1
$10^{-5}$ mol/L ATRA	25.17
$10^{-5}$ mol/L ATRA+ $10^{-7}$ mol/L PD98059	26.53
$10^{-5}$ mol/L ATRA+ $10^{-6}$ mol/L PD98059	30.33
$10^{-5}$ mol/L ATRA+ $10^{-5}$ mol/L PD98059	32.47

配对 *t* 检验: 单纯 ATRA 实验组 *vs* 正常对照组,  $t=6.23$ ,  $P < 0.05$ ,  $n=3$ 。

*F* 检验: 正常对照组 *vs* 不同浓度 PD98059+ATRA 组,  $F=187.9$ ,  $P < 0.01$ ,  $n=12$ 。

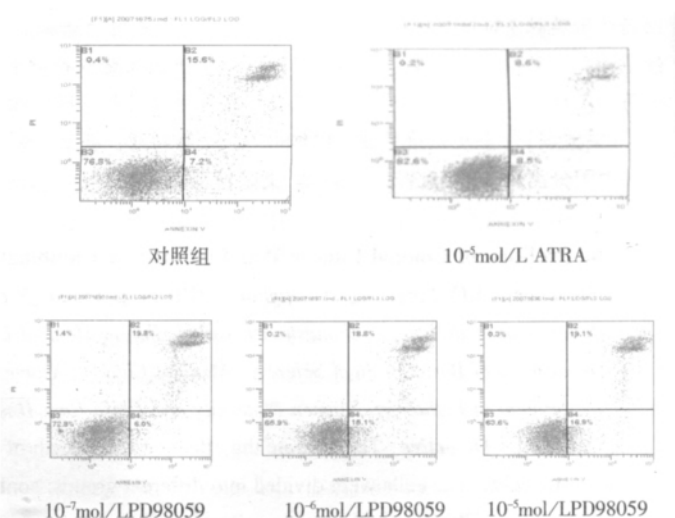


图 2 PI 染色流式细胞仪分析 LS174T 细胞凋亡图

UL、UR、LL、LR 分别指图中的左上、右上、左下、右下象限。

Figure 2 By analysis of flow cytometric, the apoptosis of tumor cells was significantly higher by the combination of PD98059 and ATRA than by ATRA.

## 3 讨论

研究报道 ATRA 可诱导肿瘤细胞的分化, 诱导肿瘤细胞的凋亡, 使细胞周期阻滞于  $G_0/G_1$  期, 减缓了肿瘤细胞内的能量代谢, 增强自然杀伤细胞识别肿瘤细胞的能力, 从而增强抗肿瘤作用。他可通过 RAR-RXR 等多条途径影响细胞代谢<sup>[1]</sup>。

MAPK 家族由 4 条主要特征性信号途径组成: 细胞外信号调节激酶 (ERKs), c-Jun 氨基端激酶/应激活蛋白激酶 (JNK/SAPK), P38 激酶及细胞外信号调节激酶 5 通路 (ERK5) 家族。他们之间存在着相互对话关系。ATRA 可通过抑制 JNK<sup>[2]</sup>, 激活 P38<sup>[3]</sup> 等信号途径抑制癌细胞增生。有资料表明在 SKBR-3 乳腺癌细胞系中 ATRA 抑制细胞生长, 但同时降低 ERK 的磷酸化<sup>[4]</sup>, 但在小鼠胚胎上颌间充质细胞则可激活此通路<sup>[5]</sup>。ATRA 对不同细胞株 ERK1/2 信号通路影响不同, 本实验 ATRA 抑制结肠癌细胞增生对 ERK1/2 信号通路的影响有待进一步证实。

ERK1/2 信号转导通路的异常活化能够导致细胞异常增殖, 恶性转化, 并丧失凋亡和分化的能力, 促使肿瘤产生。PD98059 特异性抑制 MEK1/2, 能有效抑制 ERK 的活化, 从而抑制某些

肿瘤细胞的增殖、存活。Davies 等<sup>[6]</sup>亦证实应用 PD98059 后 Hela 细胞上 ERK 磷酸化水平降低, 细胞增殖受到抑制。

此次实验用 PD98059 特异性阻断 ERK 信号通路后, ATRA 对结肠癌细胞增生的抑制的效果更显著。有报道称活化的 ERK 信号通路可促进 P3 蛋白磷酸化, 抑制促凋亡蛋白 (Bad, Bim) 的活性或表达, 引起抗凋亡蛋白 (Bcl-2, Bcl-XL) 的表达; PD98059 作为特异性 MEK/ERK 抑制剂, 可抑制 P53 蛋白磷酸化<sup>[7-9]</sup>。而 ATRA 诱导细胞后, 可抑制 P53 蛋白降解, 导致与凋亡相关的信号途径被激活 (CASPASE3 表达上调)<sup>[10]</sup>。我们推测: PD98059 与 ATRA 两种药物可能通过共同的 P53 信号途径发挥协同作用, 引起结肠癌细胞凋亡, 从而有效的发挥抗癌作用。

总之, 由于肿瘤发生机制的复杂性, 寻找有效的药物联合化疗是目前较积极的治疗手段。以上对 PD98059 与 ATRA 两种药物作用机制的初步探讨, 有助于我们进一步优化化疗方案, 在部分程度上为肿瘤的治疗展开新的前景。

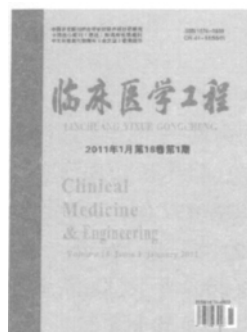
#### 参考文献

- [1] 王顺义. 维甲酸的代谢及作用方式[M]. // 肿瘤的诱导分化和凋亡疗法. 上海: 上海科学技术出版社, 1998: 65-66.
- [2] Lee HY, Walsh GL, Dawson MI, *et al.* All-trans-retinoic acid inhibits jun N-terminal kinase-dependent signaling Pathways[J]. *J Biol Chem*, 1998, 273 (12): 7066-7071.
- [3] Yazan Alsayed, Shahab Uddin, Nadim Mahmud, *et al.* Activation of Rac1 and the p38 mitogen-activated protein kinase pathway in response to all-trans-retinoic acid [J]. *J Biol Chem*, 2001, 276 (6): 4012-4019.
- [4] Shino Nakagawa, Teruhiko Fujii, Goro Yokoyama, *et al.* Cell growth inhibition by all-trans retinoic acid in SKBR-3 breast cancer cells: Involvement of protein kinase C and extracellular signal-regulated kinase mitogen-activated protein kinase [J]. *Mol Carcinog*, 2003, 38 (3): 106-116.
- [5] Zengli Yu and Ying Xing. All-trans retinoic acid inhibited chondrogenesis of mouse embryonic palate mesenchymal cells by down-regulation of TGF- $\beta$ /Smad signaling [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, 340 (3): 929-934.
- [6] Davies CC, Mason J, Wakelam MJ, *et al.* Inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase- and ERK MAPK-regulated protein synthesis reveals the pro-apoptotic properties of CD40 ligation in carcinoma cells[J]. *J Biol Chem*, 2004, 279 (2): 1011-1019.
- [7] Schuler M, Green DR. Transcription, apoptosis and p53: catch-22[J]. *Trends Genet*, 2005, 21 (3): 182-187.
- [8] Balmano K, Cook SJ. Tumour cell survival signalling by the ERK1/2 pathway[J]. *Cell Death Differ*, 2009, 16 (3): 368-377.
- [9] Kojima K, Konopleva M, Samudio IJ, *et al.* Mitogen-activated protein kinase kinase inhibition enhances nuclear proapoptotic function of p53 in a cute myelogenous leukemia cells [J]. *Cancer Res*, 2007, 67 (7): 3210-3219.
- [10] Paul Mrass, Michael Rendl, Michael Mildner, *et al.* Retinoic acid increases the expression of p53 and proapoptotic caspases and sensitizes keratinocytes to apoptosis: a possible explanation for tumor preventive action of retinoids [J]. *Cancer Res*, 2004, 64 (18): 6542-6548.

(责任编辑: 常海庆)

#### · 资讯 ·

## 2011 年 临床医学工程 杂志征稿



18 年来风雨路

- ◇ 1994 年创刊
- ◇ 2008 年更现名
- ◇ 国内统一刊号: CN 44-1655/R
- ◇ 国际标准刊号: ISSN 1674-4659
- ◇ 国内邮发代号: 46-130
- ◇ 国外发行代号: M8885

三年成绩步步高

- ◇ 刊名题写: 韩启德 (全国人大常委会副委员长, 九三学社中央主席, 中国科学技术协会主席, 北京大学医学部主任、教授, 中国科学院院士)
- ◇ 加入数据库: 万方数据 (Wanfangdata), 中国知网 (CNKI), 维普资讯 (VIP), 台湾华艺 (Airiti Library)
- (<http://www.lcyxgc.com/articles/about/BeiShouLuQingKuang/>)
- ◇ 最近三年可被引文献量 (%): 300 (59%), 421 (89%), 828 (97%)
- ◇ 最近三年影响因子 (Impact Factor): 0.049, 0.225, 0.322

原则灵活双坚持

- ◇ 审稿原则: 引用不超过 30%
- ◇ 版式特色: 不接排, 不转版, 方便查阅, 方便复印
- ◇ 栏目设置: 专家述评 (特别报道); 论著 (基础研究; 实验研究; 临床研究; 中医中药; 护理研究; 医学工程; 调查与统计; 卫生管理); 短篇报道; 教学研究; 综述
- ◇ 绿色通道: 基金论文, 研究生毕业论文

满怀信心话未来

- ◇ 中国科学引文数据库 (CSCD) 来源期刊
- ◇ 中国科技论文统计源期刊 (中国科技核心期刊)
- ◇ 中文核心期刊
- ◇ 1 至 3 家国际权威数据库

《临床医学工程》编辑部

地址: 广东省广州市广州大道北 507 号 邮编: 510500

电话: (020) 36013508; 87211107

<http://www.lcyxgc.com>

E-mail: lcyxgc001@126.com; lcyxgc006@sina.com